

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC METHOD FOR IN-VITRO DETERMINATION OF DISSOLUTION OF BROMAZEPAM IN TABLETS

**Irena Brcina**

NJSK Holding, Skopje, Republic of Macedonia

**Biljana Gjorgjeska**

Faculty of Medical Science, University Goce Delcev, Stip, Republic of Macedonia

biljana.gjorgjeska@ugd.edu.mk

**Abstract:** Disorders that involve anxiety are the most common mental disturbances. Many of the anti-anxiety drugs also cause some sedation, so the same drug is often functioning clinically as both, anxiolytic and hypnotic agent. Benzodiazepines are the most widely used anxiolytic drugs. They have largely replaced barbiturates in the treatment of anxiety, because the benzodiazepines are safer and more effective.

The main objective of dissolution testing is to guarantee the quality of the pharmaceutical product, in order to prove consistency from one batch to another and that no important change occurs during the stability study change that could impact the efficacy of the pharmaceutical product. Purpose of the dissolution test is to demonstrate drug availability in the body for the desired serum level. Also, this research is focused on reducing the time needed to perform a number of analyzes in a short period of time and this contributes to a better economic benefit.

Tablet dissolution test is a standardized method for measuring the rate of drug release from a dosage form, (FDA, 1997). For dissolution medium 0.1 M HCl was chosen, in volume of 500 ml, at 37°C, performed on ERWEKA DT 700, apparatus 2 (paddle), with 75 rpm for 45 minutes. An analytical method for Dissolution by using High Performance Liquid Chromatography technique was validated for content of Bromazepam and the validation was carried out on Shimadzu Nexera HPLC system.

To optimize chromatographic parameters several mobile phase compositions were tested in this method. A satisfactory separation, good peak symmetry and optimal retention time was obtained with mobile phase consisting a mixture of methanol, acetonitrile and potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 7.0) in ratio of 45:5:50 (v/v/v) that was set at flow rate of 1.0 ml/min was found to be optimum and further optimized by adjusting pH 7.0 by adding KOH 0.5M. A LiChrospher RP Select B column (125 × 4.0 mm, 5µm) is used as stationary phase with temperature of column oven, 50°C.

The method was validated as per ICH guidelines with respect to specificity, linearity, accuracy, precision, robustness, solution stability and filter paper compatibility. All results of validation parameters meet the limits of ICH guidelines (ICH Q2, 2005).

The proposed method is simple, rapid, accurate, precise, and specific without interference of excipients. Its chromatographic run time of 3.50 min and 3.39 min allows the analysis of a large number of samples in short period of time. Therefore, it is suitable for the routine analysis of Bromazepam in pharmaceutical dosage forms. So it could be used for the rapid and reliable determination of Bromazepam in tablet formulations.

**Keywords:** validation, analytical method, dissolution

## РАЗВОЈ И ВАЛИДАЦИЈА НА HPLC МЕТОДА ЗА IN-VITRO ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА БРЗИНАТА НА РАСТВОРАЊЕ НА БРОМАЗЕПАМ ВО ТАБЛЕТИ

**Ирена Брчина**

НЈСК холдинг, Скопје, Република Македонија

**Биљана Ѓорѓеска**

Факултет за медицински науки, Универзитет Гоце Делчев, Република Македонија

biljana.gjorgjeska@ugd.edu.mk

**Резиме:** Нарушувањата кои вклучуваат анксиозност се најчестите ментални пореметувања. Многу од анти-анксиозните лекови, исто така, предизвикуваат седација, така што истите лекови често претставуваат анксиолитици и хипнотички агенси. Бензодиазепините се најшироко користени анксиолитички лекови. Тие

во голема мера ги заменуваат барбитуратите во третманот на анксиозност, бидејќи бензодиазепините се побезбедни и поефикасни.

Цел на тестовите за растворање е да се гарантира квалитетот на фармацевтскиот производ, со цел да се докаже осетливост од една серија до друга и дека не се јавуваат важни промени во промената на студијата за стабилност која може да влијае на ефикасноста на фармацевтскиот производ. Целта на тестот за растворање е да се демонстрира достапноста на лековите во телото за саканото ниво на серум. Исто така, ова истражување се фокусира на намалување на времето потребно за изведување на бројни анализи за краток временски период и тоа придонесува за подобра економска корист. Исто така, овој труд е фокусиран на заштеда на време потребно за изведба на поголем број на анализи во пократок период а тоа допринесува за подобар економски бенефит.

Тестот за дисолуција на бромазепам таблетите претставува стандардизиран метод преку кој се прикажува ослободувањето на активната супстанца од дозираната форма, (FDA, 1997). Како медиум за растворање е избран 0,1 M HCl, во волумен од 500 ml, на 37°C, изведен на ERWEKA DT 700, апарат 2 (весло), со 75 вртежи во минута за 45 минути. Аналитичкиот метод за изведување на тестот на растворливост користи течна хроматографија под висок притисок преку кој се потврдува содржината на Bromazepam (осободување на активната супстанција) и валидацијата е спроведена на HPLC системот Shimadzu Nexera. За да се оптимизираат хроматографските параметри, неколку методи на мобилна фаза беа тестирани во овој метод. Добиена е задоволителна сепарација, добра пик-симетрија и оптимално време на задржување со мобилна фаза која се состои од мешавина на метанол, ацетонитрил и пуфер pH 7,0 (11,33 g / l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) во сооднос 45: 5: 50 (v / v / v), кој беше поставен со проток од 1,0 ml / min, и дополнително оптимизиран со прилагодување на pH 7,0 со додавање на KOH 0.5M. Како стационарна фаза се користи хроматографска колона LiChrospher RP Select B (125 × 4.0 mm, 5µm). на температура 50°C.

Методот беше потврден според упатствата на ICH во однос на специфичноста, линеарноста, точноста, прецизноста, робусноста, стабилноста на растворот и компатибилноста на филтер-хартијата. Сите резултати од параметрите за валидација ги задоволуваат границите на ICH насоките (ICH Q2, 2005).

Предложениот метод е едноставен, брз, точен, прецизен и специфичен без интерференција на ексципиенти. Времето на хроматографскиот ран од 3.50 мин односно 3.39 мин. овозможува анализа на голем број примероци во краток временски период. Затоа, таа е погодна за рутинска анализа на Bromazepam во фармацевтски дозирни форми. Така може да се користи за брзо и сигурно определување на Бромазепам во таблетните формулации.

**Клучни зборови:** валидација, аналитички метод, дисолуција

## 1. ВОВЕД

Пореметувањето на менталното здравје денес во светот претставува сериозен социомедицински проблем. Нивната етиологија сеуште не е во доволна мерка разјаснета, распространетоста е голема и има прогресивен тренд, посебно во развиените средини. Заболеното население ги опфаќа сите старосни групи, а заболување кај работното население повлекува со себе и социјално економски последици. За разлика од соматските болести, пореметувањето на менталното здравје доведува до губење на смислата и квалитетот на животот се повеќе ако болеста настапила во ран период од животот. Лекувањето на оваа група на пореметувања на здравјето е недоволно ефикасно и скапо и потребен е ангажман на значаен дел од болнички и вонболнички капацитет. Според проценката на СЗО денеска во светот живеат повеќе од 400 милиони луѓе кои боледуваат од ментални пореметувања. Во Европскиот регион СЗО проценува дека менталните пореметувања претставуваат се позначаен здравствен и социјален проблем бидејќи преваленцата се движи повеќе од 5% од севкупното население. Анксиолитиците претставуваат лекови кои се користат за ублажување на лесни психички пореметувања, неурози. Често се користат за ублажување на последиците од стрес, напнатост, тегоби и слични пореметувања. Анксиозноста како пореметување опфаќа генерализирани пореметувања (константна состојба на претерана анксиозност без никаков повод), панични пореметувања (напади на прекумерен страв кој се јавува заедно со одредени соматски симптоми како што се потење, тахикардија, болка во градите, тресење, гушење); фобии (силни стравови од одредени појави и ситуации); пореметувања во тек на пост-трауматски стрес (анксиозност предизвикана од постојано сеќавање на поминати стресни искуства). Ефекти од анксиолитиците се: седација (смирување), елиминација на стравови, напнатост и тегоби, индукција при спиење. Со тоа анксиолитиците се однесуваат како антиконвулзиви,

централни миорелаксанти и централни антихипертензивни. Во оваа група на лекови спаѓаат бензодиазепините како што е бромазепамот.

За самата формулација на лекот неопходно е освен изборот на активната супстанција и нејзините физичко-хемиски, фармацевтско-технолошки карактеристики, изборот на соодветни ексципиенси, постапката за изработка и нејзина стабилност потребно е да се разгледуваат и биофармацевтските својства на истата. Биофармацевтска карактеризација на препаратот подразбира идентификација на механизмот на ослободување на активната компонента од лековитиот облик, избор на експерименталните услови за испитување на брзината на растворање *in vitro* кои се во корелација со *in vivo* податоците, одредување на профилот на ослободување на лековитата супстанција *in vivo* и нејзината биолошка расположливост, како и идентификација на факторите кои влијаат на ослободување на лековитата супстанција *in vitro* и *in vivo*. *In vitro* – *in vivo* корелација претставува меѓусебна замена на еден ист лек од различни производители со различни ексципиенси или технолошка постапка на добивање кои треба да дадат ист клинички ефект. Терапевтската еквиваленција понекогаш е тешко да се измери во клинички услови па затоа се дефинира биолошка еквиваленција на препаратот. Биоеквиваленцијата претставува отсуство на значајна разлика во брзината и степенот во која активната супстанција од фармацевтскиот еквивалент или алтернатива доаѓа на местото на делување кога еквивалентите се применуваат во иста доза и под исти услови во рамките на соодветните студии. Идејата за испитување на брзината на растворање на лековитата супстанција и воспоставување на *In vitro* – *in vivo* корелација довеле до развој на тестот на растворање (Dissolution test). *In vitro* – *in vivo* корелација се дефинира како воспоставување на однос помеѓу некое биолошко својство или параметар кој се изведува врз основа на биолошкиот ефект на предизвиканото дејство на лековитиот облик и физичко-хемиски карактеристики на истиот. Најчесто овој поим се однесува на воспоставување на квантитативниот однос помеѓу профилот на брзината на растворање *in vitro* и фармакокинетичките параметри кои го карактеризираат временскиот тек на ослободување или апсорпција на лекот во организмот. Целта на воспоставување на оваа корелација е намалување на бројот на повторени *in vivo* испитувања кај луѓето кои се скапи, комплицирани и долго траат и со тоа се намалува времето и трошоците потребни за развој на формулацијата како и нејзина регистрација и пострегистрациони промени. Кога ќе се воспостави *in vitro*-*in vivo* корелација доволно е само *in vitro* испитување на препаратот за да се процени и предвиди биолошката расположливост или биолошката еквиваленција на готовиот производ. За оваа цел направена е систематизација<sup>1</sup> или Биофармацевтски систем за класификација на лековите (Biopharmaceutics Classification System, BCS) кој се заснова на растворливоста на лековитата супстанција, нејзината пермеабилност и брзината на растворање од лековитиот облик *in vitro*.

### 1.1. Тест на растворливост

Тестот на растворливост претставува тест кој покажува колку една активна супстанција се раствора во одреден медиум по пропишаното време.

Тестот се одредува:

- Во една временска точка (моментално ослободување<sup>2</sup>)
- Во повеќе временски точки (продолжено ослободување)
- Во две фази (одложено ослободување)

Дозволено варирање во една точка е +/- 10 %.

Тестот на растворливост, претставува одредување на количината на активна супстанција која е растворена во медиумот после пропишаното време, а се изразува како процент од декларираната содржина на активна супстанција во фармацевтската дозирана форма.

### 1. 2. Хроматографија и хроматографски техники

Сепарирањето и изолирањето на природни производи не може да се замисли без употреба на различни хроматографски техники. Хроматографијата претставува процес на разделување на компонентите од анализираната смеша во зависност од нивната распределба меѓу мобилната (подвижната) фаза и стационарната (неподвижната) фаза. Една супстанца се распределува меѓу двете фази како резултат на интеракциите кои постојат меѓу молекулите од таа супстанца и молекулите од двете фази.

За основоположник на хроматографските методи се смета рускиот ботаничар Михаил Цвет. Тој раздвојувал растителни пигменти со примена на колонска течно-цврста хроматографија, користејќи различни цврсти атсорбенти во стаклена колона како стационарна фаза и различни растворувачи како мобилна фаза. Името хроматографија потекнува од зборовите „chromos”-боја и „graphien” пишува. Иако модерната хроматографија

не е врзана за обоени соединенија, името хроматографија и понатаму останува, но денес ги опфаќа сите методи каде се врши разделување на компонентите помеѓу две фази.

Во педесетите години од дваесетиот век се развила гасната хроматографија со цел да се забрза процесот на разделување и определување на компонентите. Таа особено нашла примена при карактеризација на нафтата и нејзините деривати. Но, нејзината главна слабост, неможност да се примени на тешко испарливи и термолабилни супстанции, придонела истражувањата повторно да се вратат на унапредување на хроматографски техники каде мобилната фаза е течна. Забрзувањето на процесот на разделување и анализа при употреба на течна мобилна фаза се постигнува со внесување на течната фаза под висок притисок. Оттаму и името на современа течна хроматографија-течна хроматографија под висок притисок (Hight Pressure Liquid Chromatography) (во почетокот) а денес заради големата ефикасност, високоефикасна течна хроматографија (Hight Performance Liquid Chromatography-HPLC)

## 2. ЦЕЛИ

Главна цел на овој труд е да се развие валидна метода за испитување на тестот за растворливост на таблети Bromazepam од 1.5mg, 3mg и 6mg. Со новата развиена и валидирана метода да се скрати времетраењето на анализите за да се постигне подобар економски бенефит.

## 3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

### 3.1. Материјали

Како материјал за овој труд беа користени следните серии:

Серија I-2015, Серија II-2015, Серија III-2015 од таблети Bromazepam 1.5mg

### 3.2. Методи

Методите кои се користени во овој специјалистички труд се однесуваат на сите три јачини на Bromazepam таблети од 1.5mg, 3mg и 6mg.

**Дисолуционен медиум:** 0,1 M HCl, 500 ml .; 37°C

**Апарат:** Апарат 2 (весло), 75 вртежи во минута.

**Време:** 45 минути

#### Реагенси:

Метанол (methanol for liquid chromatography, Merck)

Ацетонитрил (acetonitrile gradient grade for liquid chromatography)

0,1 M HCl (hydrochloric acid, Sigma-Aldrich)

КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> (potassium dihydrogen phosphate, Sigma-Aldrich)

Орто-фосфорна киселина (phosphoric acid, Sigma-Aldrich)

Пуферски раствор pH = 7,0

#### Мобилна фаза

Мешавина на Ацетонитрил: Метанол: Пуфер pH = 7,0 во сооднос 5:45: 50, филтриран и дегазиран.

**Апаратура:** HPLC систем опремен со терциерна пумпа, спектрофотометриски детектор со фото диода, термостатска комора на хроматографската колона, компјутер со соодветна софтверска поддршка и печатач.

#### 3.2.1. Дисолуционен тест

##### Подготовка на стандарден раствор

Растворете точно измерено количество на 15 mg Bromazepam работен стандард во 50 ml волуметриска колба и додадете 30 ml метанол со мешање до целосно растворање. Разредете со 0,1 M HCl до марката и промешајте.

5ml од овој раствор се разредува до 50ml со 0.1 M HCl и се меша.

5 ml од овој раствор се префрлаат во 50 ml волуметриска колба, се разредува со 0.1 M HCl и се меша. (околу 0.003 mg / ml Bromazepam WS)

##### Подготовка на пробен раствор:

Пропишаниот волумен на 0,1 M HCl се поставува во конусниот сад на апаратот за определување на растворливост и се загрева на 37±0,5°C. Се поставува веслото на височина од 25 ± 2mm од долниот дел на веслото до дното на садот.

Внимателно се става една таблета во чашата на апаратот и се потопува во дисолуциониот медиум, внимавајќи на нејзината површина да не се создадат воздушни меури. Веднаш се вклучува апаратот во специфицираното време од 45 минути и се поклопуваат чашите од апаратот со соодветниот капак. По

истекот на пропишаното време, со пипета на височина од околу половина од површината на дисолуциониот флуид и врвот на веслото, не поблиску од 1cm од сидовите на садот) се узорцира волумен од околу 50ml од добиениот раствор и се филтрира со отфрлање на првите 10ml од филтратот.

### 3.2.2. Метод за анализа и хроматографски систем

#### Хроматографски систем

Колона: LiChrospher RP-Select B, 125 x 4.6mm, 5 µm, Merck

Проток: 1,0 ml / min бранова должина= 239 nm

Волумен на инјектирање: 20 µL

Температура: 50°C.

Соодветноста на системот се определува со пет последователни инјектирања на стандардниот раствор и определување на добиената вредност за RSD во проценти на добиените површини на пиковите од добиените хроматограми на Bromazepam која не треба да изнесува повеќе од 2%. Факторот на развлекување на 5% од висината на пикот на Bromazepam не треба да изнесува повеќе од 2.

#### 3.2.2.1. Постапка

Одделно инјектирајте еднаква количина (20 µL) од стандардниот раствор и пробниот раствор во хроматографскиот систем и сочувајте ги хроматограмите. Пробниот и стандардниот раствор се филтрираат низ 0.45 µm филтер PTFE и понатаму се врши определување на растворливоста на Bromazepam од таблетната формулација изразена во проценти од декларираната содржина.

Пресметајте го количеството на растворен Bromazepam во % со формулата:

$$\% \text{ Растворен Bromazepam (од декларираниот состав)} = \frac{\text{Au} \cdot \text{Wst} \cdot 10}{\text{Ast} \cdot 3} \cdot \frac{\text{P}}{100} \cdot \frac{(100 - \% \text{M})}{100}$$

Каде Wst е одвага на Bromazepam RS во стандардниот раствор во mg, P е потенцијата на работениот стандард на Bromazepam во %, % M е влага изразена во % од работениот стандард на Bromazepam, а Au и Ast се површините на Bromazepam добиени од подготовката на стандардниот расвор и пробниот раствор, соодветно.

Граници: мин. 85% (Q + 5) растворен Bromazepam/tbl од декларираната содржина во рок од 45 мин.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1 Приказ на резултати на валидациски параметри за Bromazepam таблети а 1.5 mg

Табела 1. Резултати од системска прецизност на таблети Bromazepam 1.5mg

Репликации	Прецизност на површината на пикот и RT на пикот на Bromazepam	
	Површина	RT
1	360137	3,505
2	360996	3,506
3	359452	3,523
4	360364	3,522
5	361410	3,505
6	358946	3,492
Mean	360217	3,508
SD	922,90	0,0117
RSD	0,2562	0,3359

Резултатите добиени од шест репликации на стандарден раствор инјектиран во хроматографскиот систем, покажуваат дека процентот на релативна стандардна девијација од површината на пикот и времето на задржување на Bromazepam се во границите кои се поставени за прецизност на системот (не повеќе од 2,0%).

Фактор на сличност

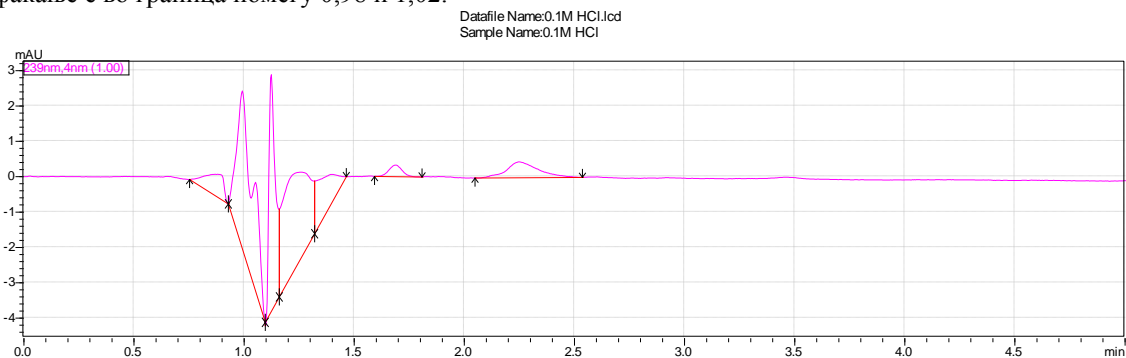
Резултати:

360217 x 15,03

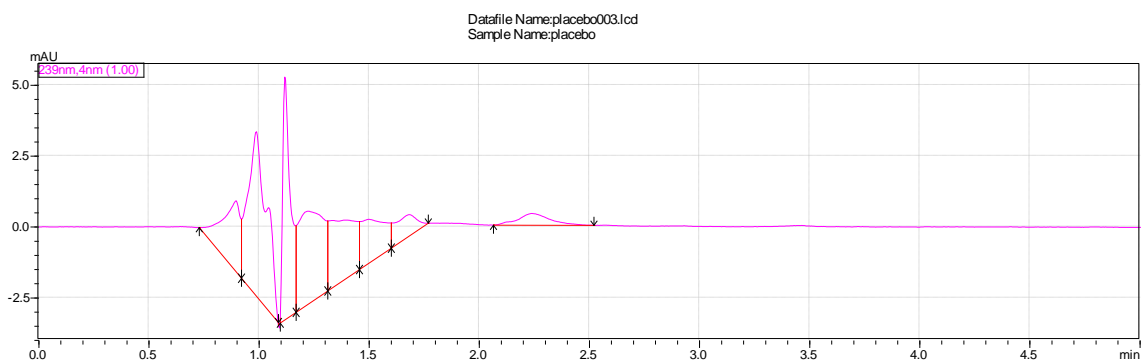
360411 x 15,11

= 0,9941

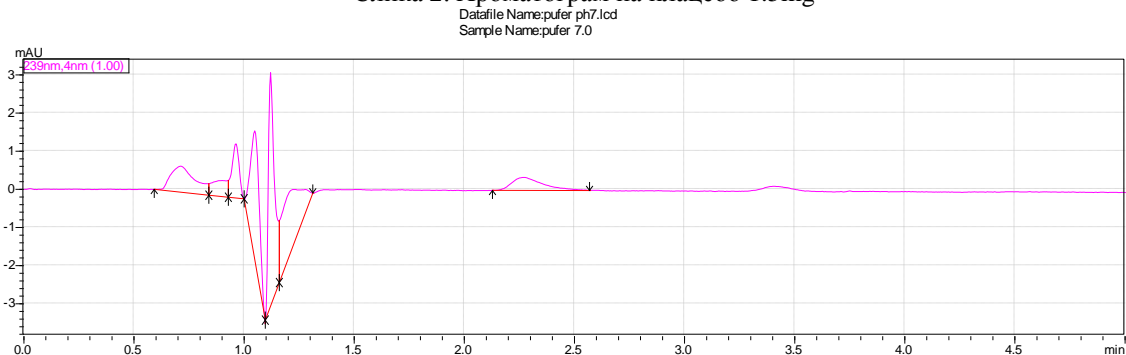
Факторот на сличност помеѓу две репликации (одделно подготвен и инјектиран) според критериумот за прифаќање е во граница помеѓу 0,98 и 1,02.



Слика 1. Хроматограм на 0.1M HCl



Слика 2. Хроматограм на плацебо 1.5mg



Слика 3. Хроматограм на пуфер pH=7

Специфичноста на методот е мониторирана преку следење на интерференции од растворувач и плацебо. Хроматограмите од тест растворот, подготовката на плацебо, медиумот за растворање и стандардниот раствор покажаа дека нема интерференции помеѓу Bromazepam и медиумот за растворање. Со студијата се

покажа дека резултатите се во граници на критериумите за прифаќање утврдени за специфичност и студијата за соодветност на системот, што покажува дека методот е специфичен.

Табела 2. Резултати од прецизност на методот Bromazepam 1.5mg

Репликации		1	2	3	4	5	6	Средна вредност
Серија. I-2015-1,5mg	Површина на пик	305891	304056	303984	300717	305619	304056	304054
	Растворливост %	93,05	92,49	92,47	91,48	92,97	92,49	92,49
	SD (% растворливост)							0,5593
	RSD (% растворливост)							0,6047
Серија. II-2015- 1,5mg	Површина на пик	294675	300011	306690	291481	306163	300499	299920
	Растворливост %	89,64	91,26	93,3	89,67	93,13	91,41	91,40
	SD (% растворливост)							1,5945
	RSD (% растворливост)							1,7445
Серија. III-2015-1,5mg	Површина на пик	308165	302206	306872	293507	300259	306138	302858
	Растворливост %	93,74	91,93	93,35	89,28	91,34	93,13	92,13
	SD (% растворливост)							1,6653
	RSD (% растворливост)							1,8076

За прецизност на методот добиени се повторливи резултати за различни раствори на 3 серии. Со тоа се утврдува дека % RSD е поставен во рамките на лимитот (помалку од 2,0%).

Табела 3. Приказ на резултати од точност на методот за Bromazepam 1.5mg

Конц. mg /ml		Добиена конц mg/ml	Аналитички принос %	Средна вредност на аналитички принос %
0,0018 (60%)	1	0,00181	100,55	100,92
	2	0,00182	101,11	
	3	0,00182	101,11	
0.0024 (80%)	1	0,00242	100,83	100,97
	2	0,00242	100,83	



	3	0,00243	101,25	
0.003 (100%)	1	0,0031	100,33	100,64
	2	0,0033	101,0	
	3	0,0032	100,60	
0.0036 (120%)	1	0.00361	100,27	100,45
	2	0,00362	100,55	
	3	0,00362	100,55	
0.0042 (140%)	1	0,00422	100,47	100,55
	2	0,00422	100,47	
	3	0,00423	100,71	

Соодветноста на системот одговара на границите поставени за точност на методот.

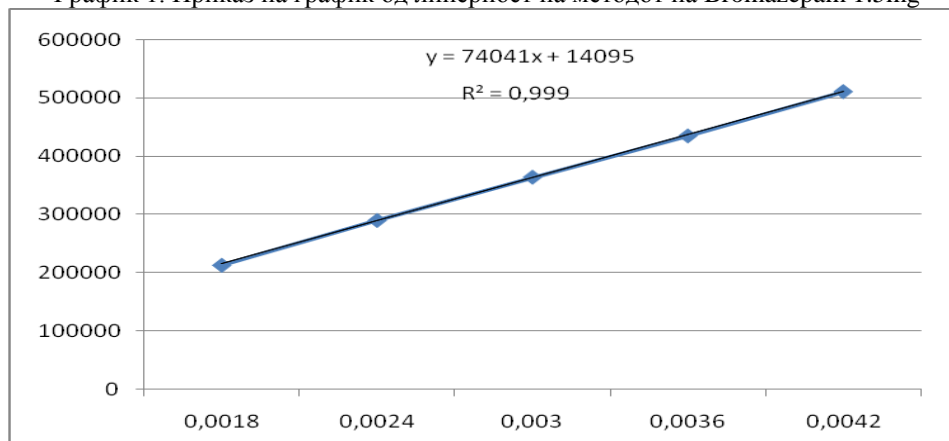
Висок аналитички принос (recovery) кој е помеѓу 100,45-100,97% и % на RSD помал од 1%, покажува дека методот е точен.

Табела 4. Приказ на резултати од линеарност на Bromazepam 1.5mg

Репликации	Површина на пик				
	0,0018 mg/ml (60%)	0,0024 mg/ml (80%)	0,003 mg/ml (100%)	0,0036 mg/ml (120%)	0,0042 mg/ml (140%)
1	213831	291734	366088	435999	510178
2	214078	291056	362396	436345	511358
3	212839	288715	365164	433937	512445
Средна вредност	213583	290502	364549	435427	511327
RSD	0,307	0,545	0,527	0,299	0,222

Ослободената активна компонента во таблети Bromazepam 1,5 mg може да се определи со прифатлив степен на линеарност, точност и прецизност на примероците кои содржат количини на аналит во опсег од 60-140%.

График 1. Приказ на график од линеарност на методот на Bromazepam 1.5mg



Методот дава линеарен график добиен за Bromazepam таблети од 1.5mg во концентрации од 60-140%. Коэффициентот на корелација е во граница од (0,995-1,0).

% RSD пресметан на секое ниво е исто така во рамките на лимитот.

Табела 5. Приказ на резултати од робусност на методот за Bromazepam 1.5mg

Репликации	Споредба на ослободен Bromazepam (%) во Серија I-2015-1,5mg анализирана од два аналитичари во различни денови.	
	Аналитичар 1	Аналитичар 2
1	92,85	92,72



2	91,56	93,20
3	89,81	93,21
4	91,24	91,72
5	92,27	91,17
6	93,51	92,24
Mean	91,87	92,37
RSD%	1,42	0,89

Истата серија беше анализирана од друг аналитичар во различен ден и резултатите добиени од двајца аналитичари покажаа дека се споредливи. Процентот на ослободување на Bromazepam во таблети од 1.5mg е во рамките на границата (не повеќе од 2,0%).

Табела 6. Валидациски параметри и резултати за Bromazepam таблети 1.5mg

Параметар	Тест	Резултати	Критериум на прифаќање
<b>Специфичност &amp; соодветност на систем</b> <b>Слепа проба</b> <b>Раствор на плацебо</b>	Интерференции Интерференции	Нема интерференции Нема интерференции	Не треба да има пик кој ќе интерферира со ретенционото време на површината на пикот на Bromazepam
<b>Линеарност &amp; Опсег</b>	Фактор на корелација на Bromazepam $R^2$	0,999	0,995 – 1,0
	% RSD за површина на пик на Bromazepam	0.222 – 0.545	Не повеќе од 2,0%
<b>Прецизност на метод</b>	% RSD of released Bromazepam	0,6047-1,8076	Не повеќе од 2,0%
<b>Точност на метод</b>	% принос (recovery) на Bromazepam	100,45-100,97	Не повеќе од 98% Не повеќе од 102%
<b>Робусност</b>	%RSD of content for Bromazepam in mg/tabl	1,42 Аналитичар 1 0,89 Аналитичар 2	Не повеќе од 2,0%

Аналитичката метода за тест за дисолуција на Bromazepam таблети 1.5mg со употреба на течна хроматографија под висок притисок беше потврдена преку процентот на ослободување на активната компонента Bromazepam и валидирана. Потврдувањето беше спроведено на HPLC системот Shimadzu Nexera а валидацијата на методот беше оценета преку воспоставување на критериуми за валидација, како што се специфичност и системска соодветност, линеарност и опсег, прецизност, точност и робусност (интермедиерна прецизност).

Аналитичкиот метод беше комплетно валидиран во согласност со насоките на меѓународната конференција за хармонизација (ICH) преку определување на линеарност, точност, прецизност и робусност.

## 5. ЗАКЛУЧОЦИ

Аналитичкиот метод кој е користен за одредување на растворање на активната компонента во таблетите Bromazepam 1,5 mg е во согласност со критериумите за прифаќање поставени за аналитичките параметри како што се специфичност, прецизност, линеарност и опсег, точност и робусност, што покажува дека методот е потврден.

Резултатите од студијата за валидација покажуваат дека предложениот аналитички метод е брз, точен, прецизен и робусен за анализа на брзина на растворање на активната компонента.

Аналитичка постапка која се користеше во овој труд е релативно ефтина, едноставна како и погодна за рутиниски анализи во краток временски интервал. Со намалувањето на времето на анализирање ја

намаливме и потрошувачката на органските растворувачи се намалува и трошокот на реагенси во лабораторијата за контрола на квалитет.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] FDA (Food and Drug Administration) Guidance for industry. Bioavailability and Bioequivalence Studies for orally administered drug products—general considerations.  
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070124.pdf>, 2003
- [2] FDA (Food and Drug Administration) Guidance for industry. Dissolution Test of immediate release solid dosage forms.  
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070237.pdf>, 1997
- [3] Ashton H. The diagnosis and management of benzodiazepine dependence, *Curr Opin Psychiatry*, 18, 2005, 249–255.
- [4] Guilherme Nobre Lima do Nascimento, Eurico Viegas Montalvão and Tales Alexandre Aversi-Ferreira, 2012, Study of the Pepsin Enzymatic Activity in in-vitro Dissolution Test of Bromazepam Tablets by UV/VIS Spectrophotometry, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 2 (10), pp. 011-015, October, 2012
- [5] European Pharmacopoeia 7 th Edition, 2010, 1507-1508
- [6] Abdelbary G., Eouani C., Prinderre P., Joachim J., Reynier J., Piccerelle P., Determination of the in vitro disintegration profile of rapidly disintegrating tablets and correlation with oral disintegration. *Int.J.Pharm.* 2005, 292: 1-2; 29-41.
- [7] USP, general chapters <711>, <1092>, <1225>, <1088>.
- [8] E Ramirez, O. Laosa, P. Guerra, B. Duque, B. Mosqueara, A.M. Borobia, S.H. Lei, A.J. Carcas, J. Frias, 2012, Acceptability and characteristics of 124 human bioequivalence studies with active substances classified according to the Biopharmaceutic Classification System, 224–225
- [9] European Pharmacopoeia 8 th Edition, 294-295
- [10] A Novel Multi compartment Dissolution Apparatus for Evaluation of Floating Dosage Form Containing Poorly Soluble Weakly Basic Drug Dr. Rajesh K. Parikh<sup>1,2</sup>, Dhaivat C. Parikh<sup>1</sup>, Renish R. Delvadia<sup>1</sup>, and Sanjay M. Patel *Dissolution Technologies*, february 2006.
- [11] Lough, W. J. & Wainer, I. W. (1995). *High Performance Liquid Chromatography, Fundamental Principles and Practise*, Blackie Academic & Professional, Glasgow
- [12] Satinder Ahuja, Stephen Scypinski: *Handbook of modern pharmaceutical analysis*, USA, 2001, 417
- [13] ICH Q2. Validation of analytical procedures: text and methodology, International Conference on Harmonization Geneva, 2005, 1-13
- [14] Joseph J. Kirkland, John W. Dolan, 2009, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, tirth edition, 256-312
- [15] Satinder Ahuja, Stephen Scypinski: *Handbook of modern pharmaceutical analysis*, USA, 2001, 419